

## 數種 眞菌類에 對한 Siccanin 및 Azalomycin-F의 抗眞菌作用의 實驗管内 實驗

延世大學校 醫科大學 微生物學敎室

高春明 崔泰周 權誠遠 柳 駿

### Studies on the Antifungal Activities of Siccanin and Azalomycin-F in vitro Tests

Choon-Myung Koh, Tae-Joo Choi, Sung-Won Kwon and Joon Lew

Dept. of Microbiology, Yonsei University, College of Medicine

**Abstract :** The discovery of ideal therapeutics of fungal infections are remain a major problems of several mycoses.

The antifungal activities of a new antifungal antibiotic named Siccanin and Azalomycin-F studies in vitro against some various species of fungi especially dermatophytes.

The antifungal activity tests were performed according to the tube-dilution method and all subcultures were incubated at room temperature for 14 days.

Results were obtained as follows:

1. All of the *Candida* spp. were grow on the various concentration of Siccanin tested but Azalomycin-F were growth inhibited at 7mcg-10mcg per ml.
2. *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. were inhibited for growth at 2mcg—6mcg per ml. and 3mcg—5mcg per ml. concentration of Siccanin and 1mcg—4mcg per ml. of Azalomycin-F.
3. Deep mycoses and some saprophytes were grow on the all tested concentration of Siccanin and Azalomycin-F.

### 緒 論

오래전부터 새로운 抗眞菌劑의 開發에 對한 研究는 여러 學者들에 依하여 行하여졌으며 이로 인하여 여러 種類의 抗眞菌劑가 發見되어 使用되어 왔으며 現在도 이에 對하여는 많은 研究가 進行되고 있다.

抗生物質中에서 特히 抗眞菌力이 있다고 報告된 것 들로서는 大部分이 polyene antibiotics들이며, Menzel 等(1944)는 fumigacin, Smith等(1954)은 oligomycin, Harned等(1951)은 nigericin, Taber等(1952)은 candidin, Tripathi等(1969)은 pyrrolnitrin, Noguchi等

(1962)은 Tinactin, Fraser 및 Knox(1959)는 nystatin, Oxford等(1939)은 griseofulvin 그리고 Gold等(1956)은 amphotericin B等을 分離하여 이에 對한 各種 細菌 및 眞菌들의 抗菌力을 調査, 우수한 抗眞菌力이 있다고 報告하였으며 이들의 數種은 실제로 臨床에 使用되고 있다.

한편, 化學藥品으로서의 Summons(1928)는 merthiolate, Smith(1947)는 alcohol, Chaplin(1952), Weber 및 Black(1947), 그리고 Armstrong(1966)等은 四價암모니움유도체, O'Brien等(1966) 그리고 吳等(1970)은 alkaline-glutaraldehyde等, 이의 여러 藥品 역시 抗菌力을 가지고 있다고 主張하였다.

이에 著者들은 日本의 Ishibashi等(1961)에 依하여 研究開發된 *Helminthosporium siccans*에서 分離하여 우수한 抗眞菌力이 있다고 報告된 Siccanin과 Arai (1960)에 依하여 *Streptomyces hydroscopicus var. azalomyceticus*에서 分離한 Azalomycin-F를 利用하여 本 教室에서 繼代 保管中인 數種의 眞菌들에 對하여 試驗管內 抗眞菌力을 調査하여 보았던 바 이에 結果를 얻을수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

## 實驗材料 및 方法

### A. 實驗材料

#### 1. 實驗에 使用된 菌株 :

本 實驗에 使用된 菌株로서는 實驗室에서 繼代 保管중인 教室 保管用 菌株로서 *Candida* spp., *Trichophyton* spp. 各 7株, *Microsporium* spp. 4株, *Aspergillus* spp. 3株, *Coccidioides immitis*, *Penicillium notatum*, *Homodendrum pedrosoi* 그리고 *Cryptococcus neoformans* 各 1株씩이었다.

#### 2. 實驗에 使用된 抗眞菌劑 :

實驗에 使用된 抗眞菌劑로서는 日本 三共株式會社에서 분양받은 Siccanin과 Azalomycin-F를 使用하였으며 이의 性질과 化學構造式은 다음과 같다.

Siccanin:  $C_{22}H_{30}O_3$ , m.p.:138°~139°C,

$[\alpha]_{D_{16}}^{20} = -150^{\circ}(\text{CHCl}_3, C=7.75)$

$\lambda_{max}^{E_{10}^1H} = 278\text{m}\mu(\text{sh}).$

Azalomycin-F:  $C_{60-63}H_{102-111}O_{15-20}N_3$ , m.p.:125°~127°C.

$[\alpha]_{D_{27}}^{20} = +35^{\circ}(C=1 \text{ in methanol})$

$\lambda_{max}^{M_{10}^1H} = 240\text{m}\mu$

### B. 實驗方法

#### 1. 抗眞菌力 測定方法 :

實驗에 使用된 抗眞菌劑 Siccanin은 ethanol, Azalomycin-F는 methanol에 용해가 可能하므로 이를 ethanol 및 methanol에 溶解, tube-dilution 方法에 의하여 各 1ml當 1<sup>r</sup>, 2<sup>r</sup>, 3<sup>r</sup>, 4<sup>r</sup>, 5<sup>r</sup>, 6<sup>r</sup>, 7<sup>r</sup>, 8<sup>r</sup>, 9<sup>r</sup>, 10<sup>r</sup>, 20<sup>r</sup>, 40<sup>r</sup>, 80<sup>r</sup> 및 100<sup>r</sup>로 희석하였으며, 使用 培地로서는 Sabouraud's 糖培地이었고 이培地上에 菌株를 接種, 室溫에서 2週間 培養, 各 濃度로 含有된 培地上에서의 菌發育與否를 관찰하여 菌發育억제농도를 측정하였으며, 이의 판단이 곤란한 例에 對하여서는 다시 1週間 계속 배양하여 발육여부를 判定하므로써 菌發育抑制 濃度를 測定하였다.

2. 水素이온 濃度指數(pH) 영향에 대한 實驗方法: 菌發育과 pH間의 關係를 관찰하기 위하여 培地의 濃度를 pH 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 調整, 여기에 菌株를 接種한 後 菌發育與否를 觀察, 抗眞菌力 測定方法에 準하여 觀察測定하였다.

## 實驗 成績

### A. Siccanin에 對한 抗眞菌作用의 實驗成績

各種 眞菌들에 對한 Siccanin의 抗眞菌成績을 보면, 表在性 眞菌症(Dermatophytosis)을 일으키는 *Trichophyton* spp.와 *Microsporium* spp.에 對하여는 種(species)의 差에 따라서 약간의 抗眞菌作用의 差異를 나타내고 있으나 實驗菌株 共히 1ml 當 2<sup>r</sup>~6<sup>r</sup> 以內에서 發育抑制 現象을 나타내었으나, 이스트樣 眞菌의 一種인 *Candida* spp.에서는 種의 差異없이 實

Table I. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of Siccanin against various fungi

Generic name	Minimal inhibitory conc.(mcg/ml.)
<i>Trichophyton fulvum</i>	2
<i>T. gypseum</i> , G-1	4
<i>T. gypseum</i> , G-2	4
<i>T. ferrugineum</i> , F-1	6
<i>T. ferrugineum</i> , F-2	2
<i>T. mentagrophytes</i> , M-1	3
<i>T. mentagrophytes</i> , M-2	3
<i>Microsporium canis</i> , C-1	4
<i>M. canis</i> , C-2	3
<i>M. gypseum</i>	5
<i>Coccidioides immitis</i>	>100
<i>Homodendrum pedrosoi</i>	>100
<i>Penicillium notatum</i>	>100
<i>Aspergillus flavus</i>	>100
<i>A. niger</i>	>100
<i>Candida albicans</i>	>100
<i>C. tropicalis</i>	>100
<i>C. pseudotropicalis</i>	>100
<i>C. paratropicalis</i>	>100
<i>C. guilliermondii</i>	>100
<i>C. krusei</i>	>100
<i>C. parakrusei</i>	>100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6

驗 藥劑 濃度에서 모두 發育抑制現象을 나타내지 못하였으며, 深在性 真菌症(deep mycoses)을 일으키는 真菌의 一種인 *Coccidioides immitis*와 *Homodendrum pedrosii* 및 非病原性 真菌의 一種인 *Aspergillus* spp. 등은 역시 抗真菌作用이 현저치 못하였다. 그러나 *Cryptococcus neoformans*는 1ml當 6<sup>r</sup>에서 發育抑制現象이 나타나는 것을 관찰할수 있었다(第1表).

**B. Azalomycin-F에 對한 抗真菌作用의 實驗 成績 :**

Azalomycin-F의 抗真菌成績을 보면, 表在性 真菌들의 菌發育抑制現象은 1ml當 4<sup>r</sup>~7<sup>r</sup>로서 비교적 우수한 抗菌力을 나타내었으며, *Candida* spp.에 對한 成績 역시 1ml當 7<sup>r</sup>~10<sup>r</sup>에서 菌發育抑制現象을 나타내었으나 深在性 真菌의 一種인 *Coccidioides immitis* 및 非病原性 真菌인 *Aspergillus* spp.들은 表在性 真菌들이나 *Candida* spp.들에 比하여는 菌發育抑制濃

Table II. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of Azalomycin-F against various fungi

Generic name	Minimal inhibitory conc.(mcg/ml.)
<i>Trichophyton ferrugineum</i> , F-1	5
<i>T. ferrugineum</i> , F-2	7
<i>T. gypseum</i> , G-1	4
<i>T. gypseum</i> , G-2	10
<i>T. mentagrophytes</i> , M-1	4
<i>Microsporium canis</i> , C-1	4
<i>M. canis</i> , C-2	5
<i>M. canis</i> , C-3	4
<i>M. gypseum</i>	7
<i>Coccidioides immitis</i>	20
<i>Candida albicans</i>	10
<i>C. tropicalis</i>	6
<i>C. pseudotropicalis</i>	7
<i>C. paratropicalis</i>	7
<i>C. guilliermondii</i>	6
<i>C. krusei</i>	10
<i>C. parakrusei</i>	7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	40
<i>Aspergillus flavus</i>	40
<i>A. niger</i>	40
<i>A. oryzae</i>	40

도가 높아 우수한 抗菌力을 나타낸다고 할수는 없겠으나 *Cryptococcus neoformans*는 1ml當 4<sup>r</sup>에서 發育抑制現象이 나타남을 볼수 있었다(第2表).

**C. Siccanin의 水素이온濃度指數(pH)에 對한 成績 :**

수소이온농도지수(pH)에 對한 영향을 보면 Siccanin의 경우 pH가 낮은 5.0에서 pH 6.0, 7.0 및 8.0에

Table III. Effect of pH on the activity of Siccanin against various fungi

Generic name	Minimal inhibitory conc.(mcg/ml) pH			
	5.0	6.0	7.0	8.0
<i>Trichophyton fulvum</i>	1	2	2	3
<i>T. gypseum</i> , G-1	2	4	4	4
<i>T. gypseum</i> , G-2	2	4	4	5
<i>T. ferrugineum</i> , F-1	4	5	6	7
<i>T. ferrugineum</i> , F-2	2	2	2	3
<i>T. mentagrophytes</i> , M-1	2	3	3	4
<i>T. mentagrophytes</i> , M-2	2	3	3	4
<i>Microsporium canis</i> , C-1	3	4	4	4
<i>M. canis</i> , C-2	2	2	3	4
<i>M. gypseum</i>	4	5	5	6

서 보다 抗真菌作用이 높은것 같아 *Trichophyton* spp. 및 *Microsporium* spp.에서 1ml當 1<sup>r</sup>~4<sup>r</sup>에서 發育抑制現象을 나타내었으나 기타 菌株에서는 큰 差異點을 볼수 없었다(第3表).

**D. Azalomycin-F의 水素이온濃度指數(pH)에 對한 成績 :**

Azalomycin-F의 水素이온濃度指數(pH)에 對한 成績을 보면, pH 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0等 각기 다른 pH上에서 發育하였을 경우, pH의 濃度の 差에 따라서 菌의 發育現象 및 發育抑制現象에 별다른 差異點을 볼수 없이 大同小異함을 관찰할수 있었다.

**考 按**

抗真菌劑에 對한 개발연구는 많은 學者들에 의하여 여러가지의 形態로서 연구되었으며, 그중에는 現在 臨床治療에 使用되고 있는것도 있다. 이들의 大部分이 抗生劑로서 알려져 있으며 이들의 大多數가 *Streptomyces*에서 얻어진다고 할수 있다.

各種 藥劑들의 抗真菌作用을 보면 吳等(1970)은

2% alkaline-glutaraldehyde의 抗真菌力의 實驗結果 Dermatophytes 6株의 경우 2% 溶液內에 침적시킨 경우 2-5分間 處理하면, 발육억제 현상이 나타난다고 하고 이와 같은 실험들은 여러 學者들에 의하여 行하여 진바 있다.

한편 Azalomycin-F는 Arai 및 Hamaro(1959) 등 日本 三共株式會社 연구진들에 의하여 개발된 抗生劑로서 *Streptomyces hydropiscus* var. *azalomycetinus* K5-4로부터 分離된 것으로서 그 抗菌力을 보면 *Candida* spp. 5株, 1.56<sup>r</sup>~6.25<sup>r</sup>/ml, *Cryptococcus neoformans* 1.56<sup>r</sup>/ml, 各種 真菌에서는 *Trichophyton* spp. 2株에서 3.12<sup>r</sup>/ml~6.25<sup>r</sup>/ml, *Aspergillus* spp. 3株에서 12.5<sup>r</sup>/ml~25<sup>r</sup>/ml 이라고 주장하였던 바 本 實驗結果 表在性 真菌중 *Trichophyton* spp.는 4<sup>r</sup>~7<sup>r</sup>/ml, *Candida* spp. 7<sup>r</sup>~10<sup>r</sup>/ml, *Cryptococcus neoformans*는 4<sup>r</sup>/ml 등으로서 他研究者와의 一致點이라 하겠으나 *Aspergillus* spp.에서는 높은 濃度에서의 發育抑制現象을 나타낸 點등은 차이점이라 할수 있다.

한편, Siccanin은 植物 病原菌의 一種인 *Helminthosporium siccanis*로부터 추출 분리한 抗生劑로서 1961年 Ishibashi에 의하여 發見되었다. 이의 抗菌作用을 보면, *T. interdigitale* 및 *T. asteroides*의 경우 發育抑制濃度は 0.1<sup>r</sup>/ml라 發表하였으며, Arai等(1968)은 Dermatophytes 18株를 비롯 기타 真菌 21株에 對한 抗真菌力을 測定하여 Dermatophytes 0.4<sup>r</sup>~6.3<sup>r</sup>/ml라 하고 기타 真菌들과 細菌들은 이보다 높은 濃도에서 發育抑制現象이 나타난다고 주장하고, 특히 gram陰性細菌의 경우는 영향을 받지 않는것 같다고 주장하였다. 이와 같은 實驗 結果와 本 實驗 結果를 比較하여 볼때, Dermatophytes의 경우, 2<sup>r</sup>/ml~6<sup>r</sup>/ml로서 他 真菌보다는 낮은 濃度에서 發育이 抑制되었으나 他 研究者들의 報告보다는 약간 發育抑制濃도가 높은 감이 있다고 하겠다. 그러나 全般的인 結果를 볼때는 다른 研究者와의 別다른 差異點을 볼수 없다.

發育抑制濃도와 pH와의 關係를 보면 Siccanin에서는 pH가 낮은 경우, pH가 높은 경우 보다 抗真菌力이 비교적 강한 結果를 나타내었으나, Azalomycin-F에서는 本 實驗例에서는 別다른 差異點을 볼수 없었던 點은 他 研究者의 結果와 一致하는 點이라 하겠다 (Ishibashi等, 1970; Arai等, 1968).

以上の 實驗을通하여 볼때, 이는 다른 種類의 抗真菌劑와 같이 좋은 抗真菌力이 있다고 하겠으며, 이에 對하여는 毒性實驗, 耐性の 形成有無, 遺傳學的인 問

題點들은 앞으로 더욱 추구하여 볼 點들이라 하겠다.

## 結 論

抗真菌劑의 一種인 Siccanin와 Azalomycin-F을 使用하여 抗真菌作用에 對한 試驗管內 實驗을 實施하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Dermatophytes의 一種인 *Trichophyton* spp. 및 *Microsporum* spp.의 抗真菌作用은 1ml當 2<sup>r</sup>~6<sup>r</sup> 및 3<sup>r</sup>~5<sup>r</sup>에서 發育抑制現象을 나타내었다.
2. 深在性 真菌의 數種과 非病原菌에 對하여는 Siccanin 및 Azalomycin-F 共히 實驗濃度에서의 抗真菌作用은 比較의 高濃度에서 抑制현상을 볼수 있었다.
3. Azalomycin-F에 對한 抗真菌力을 보면 Dermatophytes은 1ml當 4<sup>r</sup>~7<sup>r</sup> *Candida* spp.에서는 1ml當 7<sup>r</sup>~10<sup>r</sup>에서 抗真菌作用을 볼수 있었다.
4. Siccanin의 發育抑制現象은 pH가 낮은 경우가 pH가 높은 경우보다 發育抑制現象을 강함을 볼수 있었으나 Azalomycin-F에서는 別다른 영향을 볼수 없었다.

## References

- Arai, M., K. Nose, H. Nakahara, N. Kitahara and A. Naito(1968): Antimicrobial properties of Siccanin, *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **20** : 80.
- Arai, M.(1970): In vitro antimicrobial activity, *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **22** : 18.
- Armstrong, J.A. and E.J. Froelick(1964): The inactivation viruses by benzalkonium chloride, *Appl. Microbiol.*, **12** : 131.
- Central Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.(1966): Basic Studies of Azalomycin F.
- Chaplin, C.E.(1952): Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectant, *J. Bacteriol.*, **63** : 453.
- Fraser, W. and J.M. Knox(1959): Amphoterin B as a topical antifungal antibiotic, *Arch Dermat.*, **80** : 436.
- Harned, R.L., P.H. Hidy, C.J. Corum and K.L. Jones(1951): Nigericin, a new crystalline antibiotic from an unidentified *Streptomyces*, *Antibiot. Chemoth.*, **1** : 594.

- Ishibashi, K., K. Nose, T., Shindo, M. Arai and H. Mishima(1968): Siccanin, a novel acetylenic metabolite of *Helminthosporium siccans*, *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **20**: 76.
- Ishibashi, K., K. Hiral, M. Arai, S. Sugawara, A. Endo, A. Yasumura, H. Masuda and T. Muramatsu(1970): Siccanin, a new antifungal antibiotic, *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **22**: 1.
- 高春明·張泳鎬·崔大卿(1967): 兩性界面活性劑의 一種인 Dodecyl-diaminoethyl glycin hydrochloride의 抗菌作用에 對한 시험관내 실험, *中央醫學* **12**: 81.
- Menzel, A.E., O. Wintersteiner and J.C. Hoogerhelde(1944): The isolation of gliotoxin and fumigacin from culture filtrates of *Aspergillus fumigatus*, *J. Biol. Chem.*, **152**: 419.
- Miyazaki, H., K. Kuroda and I. Hamada (1969): Studies on the antifungal activity of siccanin, *Jap. J. Med. Mycol.*, **10**: 191.
- Noguchi, T., A. Kaji, Y. Igarashi and K. Taniguchi(1962): Naphthiomates 2-naphthyl anylmethylthiocarbamate, novel antitrichopyton agents, Abst. 34, 2nd Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy, p.111.
- 吳興根·宋秀憲·陳在新·高春明·崔大卿(1970): 活性 Alkaline-glutaraldehyde의 抗菌作用에 對한 試驗管内實驗, *대한마취과학회지*, **3**: 113.
- O'Brien, H.A., J. D.Jr. Mitchell, S. Haber, D.F. Rowan, T.E. Winford and J. Pellet (1966): The use of activated glutaraldehyde as a cold sterilizing agent for urological instrumentants, *J. Urol.*, **95**: 429.
- Oxford, A.E., H. Raistrick and P. Simonart (1939): Studies in the biochemistry of microorganisms, Griseofulvin, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*, *Biochem. J.*, **33**: 240.
- Seigo, K. and K. Yokoda(1963): Basic and clinical studies on an antibiotic, Azalomycin F, *World Obst Gynec.*, **15**: 207.
- Seigo, K. and K. Yamaji(1953): Basic and clinical studies on an antibiotic Azalomycin F(II).
- Smith, C.R.(1937): Alcohol as a disinfectant against the tubercle bacilli, *Pub. Health Rep.*, **62**: 1285.
- Smith, R.M., W.H. Peterson and E. McCoy (1954): Oligomycin, a new antifungal antibiotics, *Antibiot. Chemother.*, **4**: 962.
- Summons, J.S.(1943): Factericidal action mercurochrome 220 soluble and iodine in skin disinfection, *JAMA.*, **91**: 704.
- Taber, W.A., L.C. Vining and S.M. Waksman(1954): Candidin, a new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces viridoflavus*, *Antibiot. Chemother.*, **4**: 455.
- Tripathi, R.K. and D. Gottlieb(1969): Mechanisms of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin, *J. Bacteriol.*, **100**: 310.
- Weber, G.R. and L.K. Black(1947): Inhibitors for neutralizing the germicidal action of quaternary ammonium compounds, *J. Bacteriol.*, **54**: 44.